第23卷 第1期 昆虫学报 Vol. 23, No. 1
1980年2月 ACTA ENTOMOLOGICA SINICA Feb., 1980

家蚕后丝腺细胞染色质的一些特性

王宗舜 郭郛
（中国科学院动物研究所）

在家蚕幼虫发育阶段，丝腺细胞的大小和脱氧核糖核酸（DNA）的含量均有巨大增长，而没有细胞分裂发生，这种 DNA 含量的增加是由于细胞内整个染色体组型多次全部复制的结果，因此称之为多倍化现象。细胞染色体组型的多倍化现象，也在其他生物种类中存在，可是同丝腺细胞比起来可以说是相差很大。后丝腺和中丝腺每个细胞所含 DNA 最高量大约是体细胞的 20—100 万倍。这是与它们制造和分泌大量丝蛋白相一致的。后丝腺细胞是合成丝腺的核心——丝心蛋白的主要部位。为了阐明昆虫激素是如何调节和控制丝心蛋白的合成，需要分离出一定纯度的后丝腺细胞染色质来。后丝腺细胞体积大、细胞核呈树枝状使分离工作困难。我们在这方面作了一个尝试，结果报道如下：

材料和方法

材料 1975 年河北省承德蚕业研究所提供日东×华合种家蚕（*Bombyx mori*）5 龄幼虫。分成两组，一组于 5 龄 3 天（饷食后 68 小时）喷保幼激素类似物（JH-3 号）*处理蚕体，剂量每头蚕 3 微克。另一组为对照。每隔 2 小时加桑叶一次。长到第 6—7 天取材。

方法

1. 制备染色质 应用 Bram 和 Ris（1971）方法稍加改良。
2. 制备 DNA 按改良的 Marmur 方法（Paul 等，1968）。
3. 染色质化学成分的分部
4. 染色质化学成分的测定 蛋白质测定按 Lowry（1951）方法，标准样品为牛血清蛋白（上海东风厂）。二苯胺反应测定 DNA，按 Burton（1968）改良方法，标准样品小牛胸腺 DNA（B.D.H）。苔黑酚反应测定 RNA（Schjeide, 1969），标准样品酵母 RNA（B.D.H）。另外，从染色质在 260 毫微米的吸收峰可以计算出 DNA 的量，可与化学方法测定结果相比较。
5. 光谱分析和浊度测定 染色质的浊度是在波长为 320 和 260 毫微米时染色质光密度的比值。
6. 热变性实验和融点（T_m）值的测定 热变性实验是采用加热—冷却不可逆变性方法进行的。
7. 电镜检查在国产 DX-2 型电镜上进行。
8. 沉降实验在 Omega 70,000 分析离心机 Schlieren 光路系统上进行。

结果和讨论

（一）染色质化学成分

染色质主要是由 DNA、RNA、组蛋白和染色体非组蛋白质四种大分子组成。表 1 是家蚕后丝腺可溶性染色质化学成分的相对含量。

本文于 1977 年 9 月收到。

* 保幼激素类似物—3 号系本所药剂毒理室合成，其结构式为 [structural formula: OCH₃ … O …]

表 1 家蚕后丝腺细胞染色质的化学成分

化学组成	正常组	JH-3 号处理组
DNA	1.00	1.00
RNA	0.084	0.052
组蛋白	0.99	1.02
非组蛋白质	1.90	1.84

从表 1 可以看出：DNA 和组蛋白之比约等于 1；DNA:RNA 大于 10；蛋白质：DNA 在 2.5 附近。表明所分离之染色质合乎纯度标准。

众所周知，不同种类细胞以及同种细胞的不同发育时期染色质的化学成分含量的比例是不同的。一般来说，DNA 和组蛋白含量的比例是较恒定的，大致等于 1；主要变化发生在 RNA 和染色体非组蛋白质部分。保幼激素类似物处理家蚕 5 龄幼虫，对后丝腺细胞染色质化学成分 RNA 和非组蛋白质似乎产生一些影响，但是这些微小差异是否真正代表两者之间的不同，尚难确定。

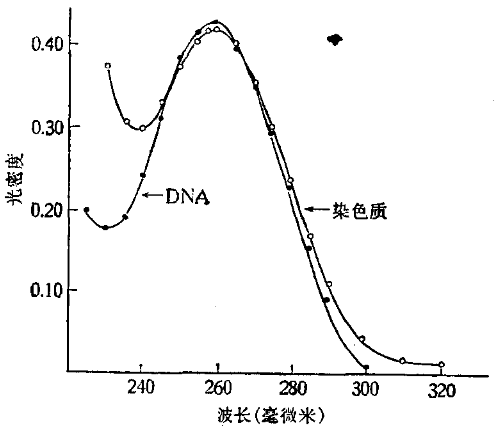


图 1 家蚕后丝腺细胞染色质和 DNA 紫外吸收光谱。染色质溶于 $PO_4^{\equiv}$，pH6.8；DNA 溶于 0.1×SSC，pH7.0。

（二）染色质和 DNA 的紫外吸收光谱

染色质和 DNA 的紫外光谱分析可以反应出它们的光谱特性和纯度。染色质溶于低离子强度水溶液($PO_4^{\equiv}$,pH6.8)，DNA 溶于标准盐溶液(0.1×SSC，pH7.0)。所得结果见图 1，表 2 和表 3。

染色质浊度不超过 0.1，表明纯度合乎标准。DNA 紫外吸收光谱的两个比值 (A_{230}/A_{260}，A_{280}/A_{260}) 比 Chinzei (1974) 报道家蚕脂肪体 DNA 的略低，然而后丝腺细胞 DNA 的 A_{260}/A_{230} 比值则与小牛胸腺 DNA 的相近，这表明 DNA 制备合乎要求，去蛋白质完全。

表 2 染色质和 DNA 的紫外吸收值

项 目	最大吸收峰(毫微米)	最小吸收峰(毫微米)
后丝腺细胞染色质	257	240
后丝腺细胞 DNA	260	230

表 3 染色质和 DNA 几种波长光密度的比值

	A_{260}/A_{230}	A_{230}/A_{260}	A_{240}/A_{260}	A_{280}/A_{260}	A_{320}/A_{260} (浊度)
后丝腺细胞染色质	—	—	0.74	0.57	0.05
后丝腺细胞 DNA	2.32 (2.25—2.40)	0.434	—	0.542	—

（三）染色质和 DNA 的热变性实验及其融点 (T_m) 温度

应用不可逆热变性方法，所实验的后丝腺细胞染色质样品，结果令人不够满意，各管之间的增色效应不够规律，上下波动较大，不能绘出其热变性曲线图。根据一些文献报道，染色质一般具有 2—3 个融点 (T_m) 温度，这些结果均是在具有连续增温装置的紫外分光光度计上获得的。尽管如此，我们仍然能够看出其增色效应的总趋势，最大增色效应接近或达到 28—29%。

家蚕后丝腺细胞 DNA 热变性实验具有一定规律性，结果绘成热变性曲线图(图 2)。最大增色效应接近或达到 33%。融点温度 (T_m) 为 70.5(0.1 × SSC, pH7.0)。保幼激素处理组后丝腺细胞 DNA 热变性的最大增色效应比正常组有所提高。可将增色效应的提高看成是保幼激素或保幼激素类似物使得 DNA 结构变得更加松弛的结果。可见使用不可逆热变性方法可以获得比较好的结果，但其最大增色效应 (33%) 要比其他可逆方法所产生的增色效应要低。这是由于在冷却过程中，一部分已经解链的 DNA 双螺旋分子又重新回到双螺旋状态的缘故。

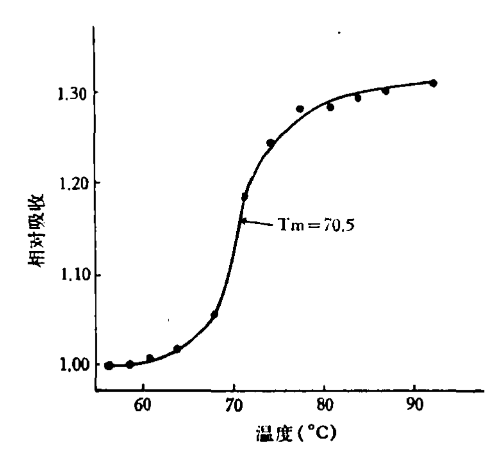


图 2　家蚕后丝腺细胞核 DNA 热变性曲线 (0.1×SSC, pH7.0)正常组

根据 DNA 融点温度 (T_m) 计算出家蚕后丝腺细胞 DNA 内鸟嘌呤和胞嘧啶 (G + C) 碱基的百分含量为 40.5(%)。此数值与家蚕脂肪体 DNA 的 G + C 百分含量 (40.8) 相一致。融点温度 (T_m, 70.5 + 15.4 = 85.9)也与脂肪体 DNA (T_m = 86) 的相符 (Chinzei, 1974)。这可能反映出家蚕丝腺多倍化细胞与双倍体体细胞的染色体组型是一致的，证明丝腺细胞的多倍化现象是其整个染色体组型多次重复的结果。

(四) 染色质的电镜检查和 DNA 的沉降实验

电镜检查所分离的后丝腺细胞染色质，杂有极少量核膜残片。染色质本身长短、大小不等，在极少情况下杂有其他细胞器，总的来讲是比较纯净的 (图版 I-1)。

对制备的 DNA 进行沉降实验，从峰形上观察，所制备 DNA 样品是纯净的 (图版 I-2)。测得沉降系数 (S 值)为 14.73S。代入下列公式:

$$S^0_{20,w} - 2.7 = 0.01517M^{0.445} \quad \text{(Gray 等, 1968)}$$

计算出 DNA 分子量为 3.3×10^6 道尔顿。

参　考　文　献

Bram, S. and Ris, H. 1971 On the structure of nucleohistone. *J. Mol. Biol.* **55**:325—36.

Burton, K. 1968 Determination of DNA concentration with diphenylamine. *Methods. Enzymol.* 12 (part B): 163.

Chinzei, Y. 1974 Biochemical properties of fat body DNA of the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Insect Physiol.* **20**:2333—46.

Gray, Jr, H. B. and Hearst, J. E. 1968 Flexibility of native DNA from the sedimentation behavior as a function of molecular weight and temperature. *J. Mol. Biol.* **35**:111—29.

Paul, J. and Gilmour, R. S. 1968 Organ-specific restriction of transcription in mammalian chromatin. *J. Mol. Biol.* **34**:305—16.

Schjeide, O. A. 1969 Micro estimation of RNA by the cupric iron catalyzed orcinol reaction. *Analyt. Biochem.* **27**:473—83.

SOME CHARACTERISTICS OF THE CHROMATIN FROM THE POSTERIOR SILK GLAND CELLS OF THE SILKWORM, *BOMBYX MORI* L.

WANG CHUNG-SHUN　　QUO FU

(Institute of Zoology, Academia Sinica)

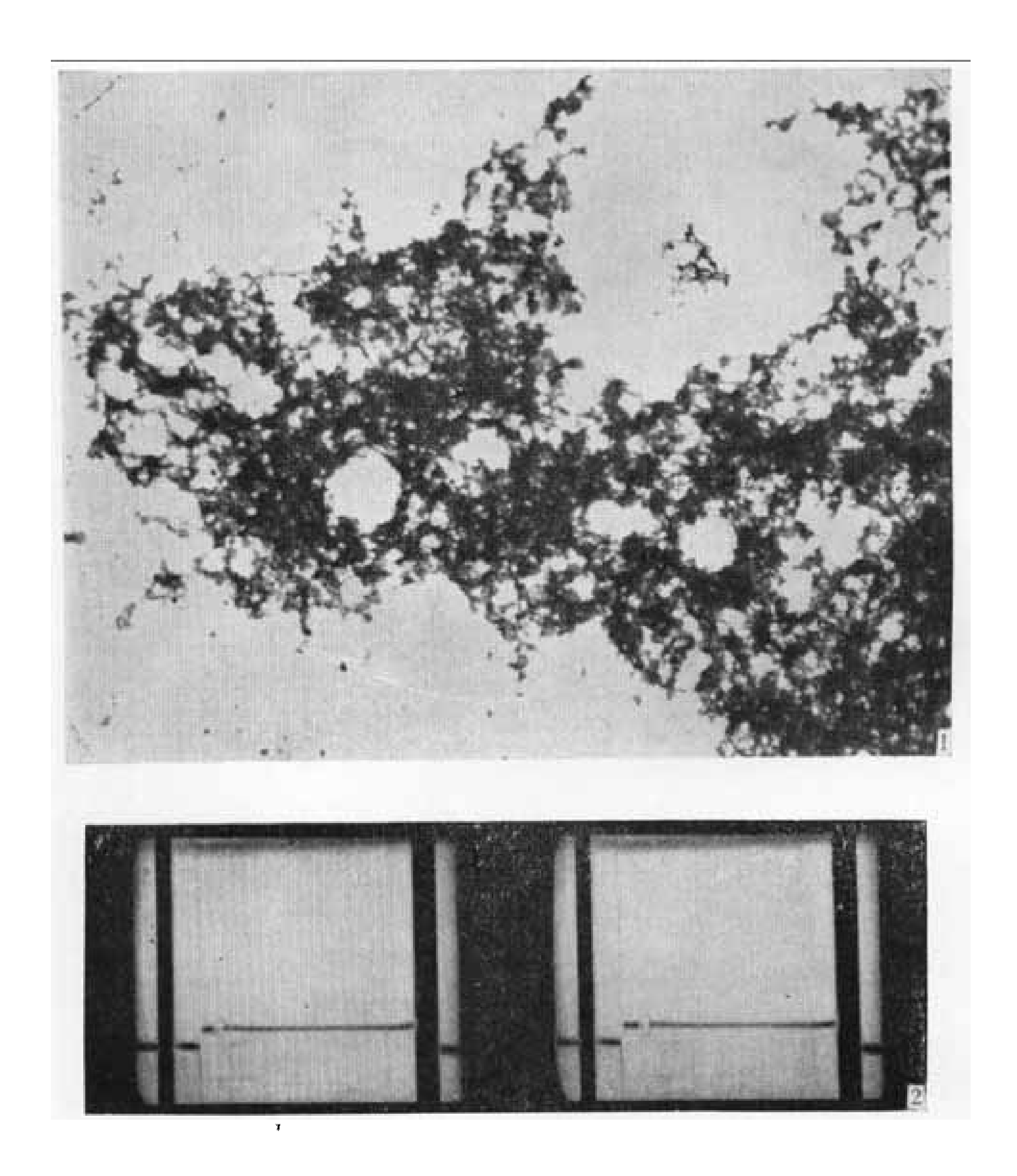


图 1　家蚕幼虫期 5 龄第 7 天后丝腺细胞分离之染色质，国产 DX-2 型电镜照像。(×13,000)

图 2　家蚕幼虫期 5 龄第 7 天后丝腺细胞核 DNA 沉降实验。样品 0.6 毫克/毫升，转速 35,000 转/分，温度 20℃，达速后 20 分钟拍照。(放大 2.4 倍)